

ČESkoslovenská
socialistická
republika
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

247484

E6

(11) (B1)

(S1) Int. Cl.⁴

A 61 K 39/395

+ E6 A
(translation)

/22/ Přihlášeno 12 04 85
/21/ PV 2724-85

(40) Zveřejněno 15 05 86

(45) Vydané 15 12 87

(75)
Autor vynálezu

HAMŠKOVÁ EVA RNDr., PARDON JÁN Ing., ULRICH STANISLAV RNDr.,
PRAHA

(54) Způsob přípravy imunoglobulinu proti lidským lymfocytům

Rešení se týká oboru výroby imunobiologických preparátů pro terapeutické účely.

Reší se způsob přípravy imunoglobulinu proti lidským lymfocytům /thymocytům/. Uvedené imunoglobuliny se vyznačují imunosupresivními účinky využívanými při přenosech tkání a orgánů.

Podstatou řešení je jednoduchý postup izolace frakce imunoglobulinů ze séra immunizovaných zvířat založený na srážecích reakcích. Při teplotě 18 až 22 °C a pH 4,15 až 4,25 dochází v prvním stupni k oddělení roztoku imunoglobulinů od sraženiny balastních bílkovin s kyselinou kaprylovou. Ve druhém stupni se frakce imunoglobulinů purifikuje srážením etanolem při teplotě -6 až -10 °C. Postupem zůstává zachován nativní charakter molekuly imunoglobulinů, které mají biologické vlastnosti vhodné pro požadované použití preparátu.

247484

BEST AVAILABLE COPY

Vynález řeší způsob přípravy imunoglobulinu proti lidským lymfocytům.

Při chirurgických přenosech tkání a orgánů je využíváno imunosupresivních látek. Purifi-kovaný zvěřecí imunoglobulin proti lidským lymfocytům má proti jiným imunosupresivním látkám nebo záření řadu výhod, pro které je při transplantacích využíván.

Zdrojem protiletík je sérum zvířat imunizovaných lidskými lymfocyty. Preparát připravo-vaný v minulosti z antilymfocytárního séra nevykazoval vhodné imunosupresivní účinky. Pro izolaci imunoglobulinové frakce bylo používáno vysolování síranem amonným s následující sorpcí balastních bílkovin na iontoměničích a konečným vysycením nebo purifikačních postupů využívajících pouze iontoměničů.

Rovněž byla zkoušena izolační metoda založená na srážení rivanolem. Metoda nebyla pro izolaci v provozním měřítku vhodná, v sedmdesátých letech byla využívána v USA - Stanford Univ. Hospital v Kalifornii.

Protože se nejedná o běžný komerční preparát - imunoglobulin proti lidským thymocytům, je možné aplikovat pouze ve speciálních zdravotnických zařízeních, která se zabývají pře-nosem tkání a orgánů - je jeho příprava omezena pouze na malý počet výrobců.

Pro produkci malých množství se využívá postupu založených na principech afinitní chro-matografie, ionexové chromatografie a sorpce na specifických sorbentech. Společnou nevýhodou citovaných postupů je vysoká cena sorpčních materiálů, použitelnost pouze pro zpracování ma-lých objemů séra a tím i vysoká cena konečného preparátu.

Navržený způsob izolace imunoglobulinu ze séra zvířat imunizovaných lidskými thymocytů, tj. lymfocyty izolovanými z thymu, má veškeré přednosti srážecích postupů, pokud se jedná o zpracovaný objem a protože ostatní sérové bílkoviny zvěřecího séra jsou pro terapeutické účely nepoužitelné, je celá izolace zjednodušena do dvou fracionačních stupňů - vyšrážení balastních bílkovin kyselinou kaprylovou a přesrážení frakce imunoglobulinů za snížené teploty etanolem.

Jednoduchost postupu a nízká cena srážecích činidel zvyšuje efektivnost postupu pro použití ve větších objemech a zaručuje vysoké výtěžky preparátu při nízkých nákladech. Na-vržený postup je i proti postupu popsánu pro přípravu lidského imunoglobulinu obohacenému o IgA a IgM zjednodušen o purifikační stupně srážení fosforečnanem vápenatým pro dany pre-parát vhodnou změnou reakčních podmínek v obou použitých izolačních stupních.

Navrhovaný způsob přípravy imunoglobulinu proti lidským thymocytům spočívá v dvoustup-ňovém srážení sérových bílkovin. V prvním stupni se při teplotě 20 °C sráží většina sérových bílkovin ze séra zvířat imunizovaných lidskými lymfocyty kyselinou kaprylovou při pH 4,15 až 4,25 a teplotě 10 až 22 °C do koncentrace kyseliny kaprylové 7 až 8 % obj. v prostředí acetátových iontů.

Sediment balastních bílkovin se oddělí odstředěním a filtrace, v roztoku zůstává frakce imunoglobulinů, která se za teploty -6 až -10 °C sráží etanolem v koncentraci 25 až 30 % obj. Sediment imunoglobulinů se rozpustí ve vodě obsahující glukózu a glycin jako stabilizátor. Vodný roztok se suší lyofilizací, rozpustí ve vodě, upraví koncentrace účinné složky a sta-bilizátoru a po rozplnění znova lyofilizuje za sterilních podmínek.

Příklad 1

Sérum králiků imunizovaných lidskými thymocyty uchovávané při teplotě -20 °C bylo rozmařeno při teplotě +4 °C a spojena skupina sér zvířat č. 62 až 69. Výchozí objem 4 900 ml séra. Bylo přidáno 9 800 ml 0,06 M acetátového pufru pH 3,53 připraveného z redestilované apyrogenní a sterilní vody. pH zředěného séra 4,51 bylo upraveno přidáním 20 ml koncentrované kyseliny octové na hodnotu 4,28.

Ve frakcionačním kotlíku bylo sérum sráženo 375 ml kyseliny kaprylové p.a přidané během 30 minut při teplotě 20 °C. Suspenze míchána 60 minut a sediment oddělen centrifugací na kyvetové odstředivce vychlazene na +4 °C. Doba odstředování 6 minut při 3 000 ot./min.

Slabě opalescentní supernatant byl zfiltrován přes filtrační papír. pH supernatantu 4,22 bylo upraveno přidáním 79 ml 5 M roztoku hydroxidu sodného na 5,05. 12 300 ml supernatantu bylo vychlazeno ve frakcionačním kotlíku na 0 °C a při této teplotě sráženo pozvolným přidáváním 4 456 g etanolu 96 % obj. podchazeným na -15 °C. Teplota během srážení 0 °C, po přidání etanolu suspenze za stálého míchání vychlazena na teplotu -9 °C a míchána 16 hodin.

Sediment frakce imunoglobulinů byl oddělen centrifugací na kyvetové odstředivce při 3 000 ot./min. po dobu 20 minut a při teplotě -8 °C. Sediment byl rozmíchán v 1 200 ml ledové apyrogenní vody obsahující 40 g glukózy, 40 g glycina a 10 g chloridu sodného a roztok rozplněn do 7 láhví NTS 500 ml po 200 ml.

Roztok byl namražen na stěny láhví v lázni o teplotě -50 °C a usušen ve vákuu při maximální teplotě sušení 35 °C. Bylo získáno 129,3 g lyofilizátu, který obsahoval 39,3 g bílkovin, což odpovídá výtěžku 8 g čisté bílkoviny z jednoho litru séra. Lyofilizát byl rozpuštěn v 1 500 ml apyrogenní vody, roztok byl doplněn 2,75 g glycina a 3,3 g chloridu sodného a vodou do objemu 1 900 ml.

pH roztoku 5,2 bylo upraveno přidáním 1,4 ml 5 M roztoku hydroxidu sodného na hodnotu 6,74. Za semisterilních podmínek byl roztok zfiltrován sadou membránových filtrů o průměru 140 mm v pořadí: prefiltr, 1,2 μm, 0,8 μm, 0,45 μm, 0,22 μm a za sterilních podmínek sadou membránových filtrů o průměru 90 mm v pořadí: prefiltr, 0,45 μm a 0,22 μm. Roztok obsahoval:

bílkoviny	1,79 g/100 ml
glycin	2,05 g/100 ml
glukóza	1,97 g/100 ml
chlorid sodný	0,69 g/100 ml
pH	6,9

Elektroforetická čistota Ig 91,8 % hmot., roztok byl sterilní, neškodný na morčatech a myších, hodnoty pyrogenních látok vyhovující /0,0; 0,0; 0,4 °C/, byly stanoveny hemaglutininy 1:16, protilátky proti bazálním membránám glomerulů 0, vazba na lidské lymphocyty 80 až 84 %, inhibice tvorby rozet 1:500, cytotoxický test s lidskými lymphocyty 1:2 560, protilátky proti sérovým bílkovinám: stopy v oblasti IgG, tromboaglutininy a trombolyziny: negativní, inkompletní 1:2.

Roztok byl rozplněn za sterilních podmínek do 34 1 láhvíček po 5 ml a lyofilizován 48 hodin při max. teplotě 35 °C. Po uzavření láhvíček ve vákuu a zapertlování uzávěrů byla stanovena vlhkost 1,8 až 1,9 % hmot. a rozpustnost za 30 sec. na čirý bezbarvý roztok. Přípráv byl aplikován v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze - Krči pod označením ATG Sevac 02/84.

Přípráv ve všech parametrech vyhovoval požadavkům na imunosupresiva na bázi imunoglobulinů pro transplantační účely, která jsou dosud dovážena.

BEST AVAILABLE COPY

Příklad 2

Sérum krátků imunizovaných lidskými thymocyty uchovávané při teplotě -20 °C bylo rozmařeno při teplotě +4 °C a spojena skupina č. 70 až 74. Výchozí objem 3 300 ml séra. Bylo přidáno 6 600 ml 60 mM acetátového pufru pH 3,50 připraveného z redestilované apyrogenní a sterilní vody.

pH zředěného séra 4,48 bylo upraveno přidáním 15 ml koncentrované kyseliny octové na hodnotu 4,21. Ve frakcionačním kotlíku bylo sérum sráženo 250 ml kyseliny kaprylové p.a. přidané během 15 minut při teplotě 21 °C. Suspenze míchána 60 minut a sediment oddělen centrifugací na kyvetové odstředivce vychlazené na +4 °C.

Doba odstředování 10 minut při 2 800 ot./min. Opalescentní roztok byl zfiltrován přes filtrační papír. pH supernatantu 4,20 bylo upraveno přidáním 58 ml 5 M roztoku hydroxidu sodného na hodnotu 5,02. 8 150 ml supernatantu bylo vychlazeno ve frakcionačním kotlíku na 0 °C a při této teplotě bylo sráženo pozvolným přidáváním 2 955 g etanolu 96 % obj. podchlazený na -15 °C.

Teplota během srážení 0 °C, po přidání etanolu suspenze za stálého míchání vychlazena na teplotu -8 °C a míchána 18 hodin. Sediment frakce imunoglobulinů byl oddělen centrifugací na kyvetové odstředivce při 2 900 ot./min. po dobu 20 minut a při teplotě -10 °C. Sediment byl rozmíchán v 850 ml ledové apyrogenní vody obsahující 20 g glukózy, 20 g glycinu a 6 g chloridu sodného a roztok rozplněn do 5 lahvi NTS 500 ml po 200 ml.

Roztok byl namražen na stěny lahvi v lázní o teplotě ~50 °C a usušen ve vakuum při maximální teplotě sušení 35 °C. Bylo získáno 71 g lyofilizátu, který obsahoval 25 g bílkovin, což odpovídá výtěžku 7,5 g čisté bílkoviny z 1 litru séra. Lyofilizát byl rozpuštěn v 1 000 ml apyrogenní vody, roztok byl doplněn do objemu 1 100 ml.

pH roztoku 5,44 bylo upraveno přidáním 0,7 ml 5 M roztoku hydroxidu sodného na hodnotu 6,61. Za semisterilních podmínek byl roztok zfiltrován sadou membránových filtrů o průměru 146 mm v pořadí: prefiltr, 1,2 µm, 0,8 µm, 0,45 µm a 0,22 µm a za sterilních podmínek sadou membránových filtrů o průměru 90 mm v pořadí: prefiltr, 1,2 µm, 0,8 µm, 0,45 µm a 0,22 µm. Roztok obsahoval:

bílkoviny	2,06 g/100 ml
glycin	2,17 g/100 ml
glukóza	1,92 g/100 ml
chlorid sodný	0,70 g/100 ml
pH	6,68

Elektroforetická čistota 92,4 % hmot., roztok byl sterilní, neškodný na morčatech a myších, hodnoty pyrogenních látok vyhovující /0,1; 0,0; 0,1 °C/, byly stanoveny hemaglutininy 1:32 /anti A/, resp. 1:64 /anti B/, protilátky proti bazálním membránám glomerulů negativní, vazby na lidské lymfocyty 88 %, inhibice tvorby rozet 1:500, cytotoxický test s lidskými lymfocyty 1:2 560, protilátky proti sérovým bílkovinám v oblasti IgG, tromboaglutininy a trombolytice negativní.

Roztok byl rozplněn za sterilních podmínek do 186 lahviček a lyofilizován 48 hod. při max. teplotě 35 °C. Po uzavření lahviček ve vakuum a zapertlování uzávěrů byla stanovena zbytková vlhkost 1,7 % hmot. a rozpustnost za 40 s na čirý bezbarvý roztok. Preparát byl aplikován v Institutu klinické a experimentální medicíny v Praze - Krči pod označením ATG Sevac-03/84.

Preparát ve všech parametrech vyhovoval požadavkům na imunosupresiva na bázi imunglobulinů pro transplantaci účely, které jsou dosud dovážena.

P R E D M Ě T V Y N Ā L E Z U

Způsob přípravy imunoglobulinu proti lidským lymfocytům pro imunosupresivní účely při přenosech tkání a orgánů, vyznačující se tím, že se frakce imunoglobulinů obsažená v sérech zvířat imunizovaných lidskými lymfocyty, s výhodou lymfocyty izolovanými z thymu, izoluje srážením kyselinou kaprylovou při pH 4,15 až 4,25 a teplotě 18 až 22 °C do koncentrace 7 až 8 % obj. v prostředí acetátových iontů, sediment balastních bílkovin se oddělí centrifugací a případně filtrace a z čirého supernatantu se izoluje frakce imunoglobulinů srážením etanolem při teplotě -6 až -10 °C s výhodou při teplotě -8 °C a při konečné koncentraci etanolu 25 až 30 % obj.

Patent CS 247484 B1

(22) Filed April 12, 1985

(21) PV 2724-85

(51) Int. Cl.⁴ - A 61 K 39/395

(40) Published May 15, 1986

(45) Issued December 15, 1987

(75) Author of the invention

Hanšíková Eva RNDr., Pardon Jan ing., Ulrych Stanislav
RNDr., Prague

(54) Title

A method of preparing immunoglobulin against human lymphocytes

The invention relates to a producing of immunoglobulin preparations for therapeutic purposes.

The object of the invention is a method of preparing an immunoglobulin against human lymphocytes (thymocytes). Said immunoglobulins are characterized by immunosuppressive effects usable in tissue and organ transfers.

The subject-matter of the invention is a simple process of isolation of an immunoglobulin fraction from serum of immunized animals wherein the process is based on precipitation reactions. In the first step realized at a temperature of 18°C to 22°C and at a pH value of 4.15 to 4.25, the separation of an immunoglobulin solution from a precipitate of ballast proteins with caprylic acid takes place. In the second step, the obtained immunoglobulin fraction is purified by precipitation with ethanol at a temperature of -6°C to -10°C. This process keeps the native character of the immunoglobulin molecules that have

biological properties suitable for the required use of the preparation.

The Present invention relates to a method of preparing an immunoglobulin against human lymphocytes.

During surgery transfers of tissues or organs immunosuppressive agents are used. A purified animal immunoglobulin against human lymphocytes has many advantages over the other immunosuppressive agents and therefore it is used in transplantations.

The source of antibodies is a serum from animals immunized with human lymphocytes. The prior art preparation prepared from an anti-lymphocytic serum did not show suitable immunosuppressive effects. For separating an immunosuppressive fraction a salting-out with ammonium sulphate followed by a sorption of ballast matters on ion-changers and finally saturation or purification processes by using only ion-exchangers were used.

A separating method based on a precipitation with rivanol was tested, as well. This method was not suitable for separating in the large scale; in seventies, it was used in USA -Stanford Univ. Hospital in California.

Since this preparation is not a common commercial preparation - the immunoglobulin against human lymphocytes can be only applied in specialized sanitary facilities dealing with tissue and organ transfers - the producing thereof is limited only to a small number of producers.

The processes based on principles of affinity chromatography, ion-exchanger chromatography and sorption on specific sorbents are used for a laboratory scale

production. The common disadvantage of said methods is a high cost of sorption materials, usability only for treatment of small volumes of a serum and thus even high cost of the final preparation.

The present process of isolation of immunoglobulin from serum of animals immunized with human thymocytes, i.e. lymphocytes isolated from thymus glands, has all the advantages of precipitation processes, as regards to a treated volume, and because other serum proteins of animal serum are not suitable for therapeutic purposes, the all isolation is simplified into two fractionating steps - precipitation of ballast proteins with caprylic acid and re-precipitation of the immunoglobulin fraction with ethanol at a lowered temperature.

The simplicity of the present process and a low cost of precipitation agents increase the effectiveness of said process in a large-scale use and guarantee high yields of the preparation with low process costs. The present process is simplified for the given preparation by a suitable change of reaction conditions in the both used isolation steps which makes possible to avoid a purifying step of precipitating with calcium phosphate even against the described process of preparing of human immunoglobulin enriched with IgA and IgM.

The present method of preparing an immunoglobulin against human lymphocytes consists in two-step precipitation of serum proteins. In the first step realized at a temperature of 20 °C, the most of serum proteins from serum of animals immunized with human lymphocytes is precipitated with caprylic acid at pH of 4.15 to 4.25, at a temperature of 10°C to 22°C and in the presence of acetate

ions to the caprylic acid concentration of 7 to 8 % by volume.

The sediment of ballast proteins is separated by centrifuging and filtrating, the fraction of immuglobulins keeping in a solution is precipitated with ethanol at concentration of 25 % to 30 % by volume and at a temperature of -6°C to -10°C. The sediment of immuglobulins is dissolved in water containing glucose and glycerin as stabilizers. The aqueous solution is dried by lyophilizing, is dissolved in water, the concentrations of the active ingredient and stabilizer are adjusted; and after filling into the bottles the solution is again lyophilized under sterile conditions.

Example 1

Serum from rabbits immunized with human lymphocytes stored at -20°C was allowed to thaw at +4°C and groups of sera No. 62 and No. 69 were combined. The starting volume was 4900 ml of serum. 9800 mL of 0,06 M acetate buffer (pH 3,53) prepared from redistilled apyrogenic and sterilized water was added. The resulting pH 4,41 of diluted serum was adjusted to 4,28 by adding 20 mL of concentrated acetic acid.

In a fractionating kettle, the serum was precipitated by adding 375 mL of caprylic acid at 20°C for 30 minute. The suspension was stirred 60 min and the sediment was separated by centrifuging in a cuvette centrifuge cooled to +4°C at 3000 rpm for 6 minute.

Slightly opalescent supernatant was filtered through a filter paper. pH of the supernatant was adjusted from 4.22 to 5.05 by adding 79 mL of 5M sodium hydroxide. The resulting 12,300 mL of the supernatant was cooled to 0°C in the fractionating kettle and, at said temperature, precipitated by slowly adding 4456 g of 96% vol. ethanol cooled to -15°C. The temperature during precipitation was 0°C, after adding the ethanol the resulting suspension was cooled to -9°C and stirred for 16 hour.

The sediment of the immunoglobulin fraction was separated by centrifugation in the cuvette centrifuge at 3000 rpm and at -8°C. The sediment was dissolved in 1200 mL of ice-cold apyrogenic water containing 40 g of glucose, 40 g of glycine, and 10 g of sodium chloride. The solution was filled into bottles NTS 500 ml, 200 ml to each bottle.

The solution was frozen on walls of the bottles in a bath cooled to -50°C and vacuum dried at maximal drying temperature of 35 °C. 129.3 g of lyophilizate containing 39.3 g of proteins was obtained. The yield was 8 g of protein/L of serum. The lyophilizate was dissolved in 1500 mL of apyrogenic water and the resulting solution was added with 2.75 g of glycine, and 3.3 g of sodium chloride and water to volume of 1900 mL.

pH of the solution was adjusted to pH 6,74 by adding of 1.4 mL of 5 M solution of sodium hydroxide. Under semi-sterile conditions, the solution was filtered by using a set of membrane filters having diameter of 140 mm, in the following order: 1.2 µm, 0.8 µm, 0.45 µm, 0.22 µm, and under sterile conditions with a set of membrane filters having diameter of 90 mm in the order: prefilter, 0.45 µm, and 0.22 µm. The solution contained:

Proteins	1.79 g/100 mL
Glycine	2.05 g/100 mL
Glucose	1.97 g/100 mL
Sodium chloride	0.69 g/100 mL
pH	6.9

Ig Electrophoretic purity of 91,8 % by weight, the sterile solution, harmless for guinea pigs and mice, values of pyrogenic matter satisfied (0,0; 0,0; 0,4 °C), Hemagglutinins 1:16, antibodies against basal membranes of glomeruli 0, binding to human lymphocytes 80 % to 84 %, inhibition of rosette formation 1:500, cytotoxic test with human lymphocytes 1:2 560, antibodies against serum proteins: traces in area of IgG, tromboagglutinins and trombolysins: negative, incomplete 1:2 were determined.

The solution was filled under sterile conditions into 34L bottles, each 5 mL, and lyophilized for 48 hours at the maximal temperature of 35°C. After closing the bottles in vacuum and capping them the residual humidity of 1.8 to 1.9 % by weight and solubility to a clear colorless solution in 30 seconds were determinated. The preparation was applied in Institute of Clinic and Experimental Medicine in Prague - Krč under the trade name ATG Sevac 02/84.

The present preparation met, in all aspects, requirements for up to now imported immunosuppressive agents based on immunoglobulins intended for transplantation purposes.

Example 2

Serum from rabbits immunized with human lymphocytes stored at -20°C was allowed to thaw at +4°C and groups of sera No. 70 and No. 74 were combined. The starting volume was 3300 mL of serum. 6600 mL of 60 mM acetate buffer (pH 3,50) prepared from redistilled apyrogenic and sterilized water was added.

The resulting pH 4,48 of the diluted serum was adjusted to 4,21 by adding 15 mL of concentrated acetic acid. In a fractionating kettle, the serum was precipitated by adding 250 mL of caprylic acid at 21°C for 15 minute. The suspension was stirred 60 min and the sediment was separated by centrifuging in the cuvette centrifuge cooled to +4°C

The time of centrifuging was 10 minute at 2800 rpm. The opalescent solution was filtered through a filter paper. pH of the supernatant was adjusted from 4.20 to 5.02 by adding 58 mL of 5M sodium hydroxide solution. The resulting 8150 mL of the supernatant was cooled to 0°C in the fractionating kettle and, at said temperature, precipitated by a slowly adding 2955 g of 96% vol. ethanol cooled to -15°C.

The temperature during precipitation was 0°C, after adding the ethanol the resulting suspension was cooled to -8°C and stirred for 18 hour. The sediment of the immunoglobulin fraction was separated by the centrifugation on the cuvette centrifuge at 2900 rpm for 20 minutes and at -10°C. The sediment was dissolved in 850 mL of ice-cold apyrogenic water containing 20 g of glucose, 20 g of

glycine, and 6 g of sodium chloride and the solution was filled into 5 bottles NTS 500 ml, each 200 ml.

The solution was frozen on walls of the bottles in a bath cooled to -50°C and vacuum dried at the maximal drying temperature of 35 °C. 79 g of lyophilizate containing 25 g of proteins was obtained which corresponds to the yield of 7,5 g of protein/L of serum. The lyophilizate was dissolved in 1000 mL of apyrogenic water and the resulting solution was filled up to volume of 1100 mL.

pH of 5,44 of the solution was adjusted to pH 6,61 by adding of 0,7 mL of 5 M solution of sodium hydroxide. Under semi-sterile conditions, the solution was filtered by using a set of membrane filters having diameter of 146 mm, in the following order: 1.2 µm, 0.8 µm, 0.45 µm, 0.22 µm, and under sterile conditions with a set of membrane filters having diameter of 90 mm in the order: prefilter, 1.2 µm, 0.8 µm, 0.45 µm, and 0.22 µm. The solution contained:

Proteins	2.06 g/100 mL
Glycine	2.17 g/100 mL
Glucose	1.92 g/100 mL
Sodium chloride	0.70 g/100 mL
pH	6.68

Ig Electrophoretic purity of 92,4 % by weight, the sterile solution, harmless for guinea pigs and mice, values of pyrogenic matter satisfied (0,1; 0,0; 0,1 °C), Hemagglutinins 1:32 (anti A), and 1:64 (anti B), respectively, negative antibodies against basal membranes of glomeruli, binding to human lymphocytes 88 %, inhibition of rosette formation 1:500, cytotoxic test with human lymphocytes 1:2 560, antibodies against serum proteins in

area of IgG, negative tromboagglutinins and trombolysins were determined.

The solution was filled under sterile conditions into 186 bottles and lyophilized for 48 hours at the maximal temperature of 35°C. After sealing the bottles in vacuum and capping them the residual humidity of 1.7 % by weight and solubility to a clear colorless solution in 40 seconds were determinated. The preparation was applied in Institute of Clinic and Experimental Medicine in Prague - Krč under the trade name ATG Sevac 03/84.

The present preparation met, in all aspects, requirements for up to now imported immunosuppressive agents based on immunoglobulins intended for transplantation purposes.

Claims:

A process for producing of immunoglobulin against human lymphocytes for immunosuppressive purposes in tissue and organ transfers, characterized in that a fraction of immunoglobulins contained in serum from animals immunized with human lymphocytes, especially with those isolated from thymus glands, is isolated by precipitation with caprylic acid at pH of 4.15 to 4.25 and at a temperature of 18°C to 22°C to a concentration of 7 to 8 % by volume in the presence of acetate ions, the sediment of ballast matter is separated by the centrifuging and optionally by the filtration and the Ig fraction is isolated from the clear supernatant by precipitation with ethanol at -6°C to -10°C, preferably at -8°C and at a final concentration of ethanol of 25 to 30 % by volume.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.